

A Thy-1 (CD90) antigén expressziójának vizsgálata májban

A Thy-1 több sejtféleségen, többek között mesenchymalis és haemopoeticus őssejtek felszínén is jelenlevő antigén, funkciója nem ismert. Nagy publicitást kapott a patkányok májában az AAF/Ph kísérleti rendszerrel előidézett ovális sejteken való Thy-1 expresszió, egyrészt mert alátámasztotta az ovális sejtek potenciális csontvelői eredetét, másrészt mint felszíni antigén kiválóan alkalmazható volt az ovális sejtek FACS segítségével történő izolálására. Előzetes kísérletünk eredménye nem egyezett meg az irodalmi adatokkal ezért vizsgáltuk meg részletesen a Thy-1 expressziót fehérje és mRNS szinten is többféle kísérleti rendszerben.

Ép, felnőtt patkányok májában a Thy-1 molekula konfokális mikroszkóppal a perifériás idegátmetseteken kívül csekély mértékben a nagyobb epeutak körül volt kimutatható. Nagyobb feloldású immunoelektromikroszkópos módszerrel az epeutak körüli Thy-1 expresszió nagy valószínűséggel az ún. portális fibroblastok nyúlványaihoz volt köthető. Az AAF/Ph ovális sejtek proliferációjával járó kísérleti modellben konfokális mikroszkóppal egyértelműen megfigyelhető volt, hogy a Thy-1 jel nem az ovális sejtekhez hanem az ovális sejtekkel szoros térbeli kapcsolatban levő SMA pozitív myofibroblastokhoz köthető, a desmin pozitív aktivált stellat sejtek/myofibroblastok jóval kisebb mértékben mutattak Thy-1 pozitivitást.

A kollagenáz perfúziót követően szuszpenzióból izolált ovális sejtekből ill. szövettani metszetekből microdissectált ovális sejtekből izolált RNS-ben valós idejű RT-PCR módszerrel nem volt kimutatható a Thy-1 mRNS, ami viszont jelen volt a myofibroblastokat is tartalmazó frakcióból izolált RNS-ben, igazolva, hogy a Thy-1 molekula RNS szinten sem termelődik az ovális sejtekben.

Patkánymájban előidézett kísérletes májfibrosis modellben ill. humán cirrhotikus májmintákban egyaránt a myofibroblastokhoz volt köthető a Thy-1 expresszió immunfluoreszcens vizsgálataink szerint.

Ezek az eredmények egyértelműen alátámasztják, hogy a Thy-1 expresszió nem használható fel az ovális sejtek csontvelői eredetének igazolására viszont ennek a molekulának a további vizsgálata hozzájárulhat, a májpatológia egyik legzavarosabb fejezetének, a különböző myofibroblast populációk eredetének és jelentőségének jobb megértéséhez. Az ovális sejtek Thy-1 expressziójának cáfolatáról szóló megfigyelésünket számos később megjelent közlemény is igazolta.

A máj szerkezetének vizsgálata a regeneráció során

A máj kiváló regenerációs képessége közismert és a parciális hepatectomiát (Ph) követő regeneráció a legtöbbet tanulmányozott, nem daganatos növekedési reakciók közé tartozik. Az is általánosan elfogadott, hogy a legtöbbet rágszálókban tanulmányozott, Ph-t követő regeneráció elvileg kompenzációs hyperplasiának felel meg, mivel az eltávolított májlebenyek nem nőnek vissza, hanem a megmaradt lebenyek növekedése révén áll helyre a máj eredeti tömege. A májszövet általánosan elfogadott morfológiai alapegysége a máj lebenyke (lobulus) (A máj funkcionális alapegysége máig is tartó állandó viták tárgyát képezi, ezt kísérleteinkben nem vizsgáltuk). Az egyes májlebenyek regeneratív növekedése elvileg háromféleképpen történhet meg: a/ a májlebenyek növekedése; b/ új májlebenyek képződése c/ a két folyamat kombinálódása révén. Meglepő módon napjainkig sem volt tisztázva, hogy a fenti három lehetőség közül melyik történik meg a májregeneráció során. Ennek az a magyarázata, hogy a máj lebenyekének mérete meglehetősen nehezen vizsgálható. A májlebenyek egy bonyolult hierarchikus rendszert alkotva építik fel a májszövetet. Ezen a hierarchián belül a lebenyek mérete változik a hirtől való távolság alapján, továbbá a különböző lebenyek tengelye sem

párhuzamos. Ebből adódik, hogy hagyományos szövettani metszeteken a lebenyekék méretéről szinte semmi felvilágosítás nem nyerhető. Munkacsoportunk kidolgozott egy új módszert mely lehetővé teszi a májlebenyekék méretének objektív vizsgálatát. Azokat a korábbi megfigyeléseket használtuk ki, hogy a/ a májtok alatti lebenyekék az említett hierarchiában azonos helyet foglalnak el b/ tengelyük, ami lényegében azonos a centralis vénák legperifériásabb ágával, egymással párhuzamos és merőleges a máj felszínére. Ezért ha a hepaticus vénákon keresztül fluorescens gyantával retrográd módon feltöltöttük a centrális vénák ágrendszerét és rajtuk keresztül a sinusoidokat, a máj felszínén megbízhatóan kirajzolódtak a lebenyekék határai. A máj felszínről készített digitális felvételeken pedig képelemző programok segítségével a lebenyekék tetszőleges paraméterei objektíven meg voltak határozhatóak. Módszerünk természetesen csak a felszíni lebenyekék méretéről nyújt egyértelmű felvilágosítást, de az említett hierarchikus elrendeződés miatt ez legalábbis tendenciájában tükrözi a mélyben zajló folyamatokat is.

A/ Fenti módszert alkalmazva összehasonlítottuk a máj postnatalis, fiziológiás növekedését a sebészi parciális hepatectomiát követő regenerációval. Megállapítottuk, hogy az egyedfejlődés születést követő fázisában a máj tömegének gyarapodásához új lebenyekék képződése és a lebenyekék fokozatos növekedése is hozzájárul, ez utóbbi folyamatban pedig szerepe van a hepatocyták megnagyobbodásának is. A regeneratív növekedés során viszont kizárólag a már meglevő lebenyekék mérete növekszik, új lebenyekék nem képződnek és a hepatocyták sem képesek további megnagyobbodásra. A regeneráció eredményeként megnagyobbodott lebenyekék viszont bonyolultabb szerkezetűek. Ez tükröződik az egy centralis vénát körülvevő portális vénaágak számának megnövekedésében, továbbá abban, hogy különböző zonális megoszlást mutató enzimek (pl CYP 450 II E 1, glutamin szintetáz). A szokásos koncentrikus elrendeződés helyett karéjosított expressziós mintázatot mutatnak. Feltételezésünk szerint ezen utóbbi szerkezeti változások oka, hogy az ideális porto-centrális távolság ne növekedjen jelentős mértékben a lebenyekék megnagyobbodása következtében.

B/ Ha parciális hepatectomiát követően a hepatocyták osztódását meggátoljuk, akkor a máj tömege a progenitor/ovális sejtek részvételével pótlódik. Az ovális sejtek a Hering csatornákból kiindulva infiltrálják a máj állományát, majd az ovális sejtekből körülírt, kis hepatocytákból álló sejtcsoportok ún. focusok alakulnak ki és ezek egymással összeolvadva pótolják a hiányzó májtömeget. Ennek a szöveti reakciónak egyik legtöbbet tanulmányozott modellje az ún AAF /Ph kísérleti modell, ami acetaminofluorén kezelés és parciális hepatectomia kombinálásából áll (az AAF a hepatocyták DNS-éhez kötődve gátolja azok osztódását). Ebben a kísérleti modellben is, fentebb leírt módszerünket alkalmazva, megállapítottuk, hogy a máj tömege kizárólag a lebenyekék méretének növekedése révén áll helyre. Az ovális sejtek részvételével zajló regeneráció két kulcs eleme az ovális sejtek szaporodása majd ezt követően a focusok megjelenése. Az ovális sejtek eredetét, elrendeződését korábbi munkáinkban elemeztük. Újabb kísérleteinkben a focusok kialakulását, szerkezetét jellemeztük részletesebben. Microdissecált ovális sejtek génexpressziójának valós idejű RT-PCR módszerrel történő vizsgálatával megállapítottuk, hogy a portális tértől távolabbi (distalis) ovális sejtek differenciáltabbak (magasabb AFP, albumin TAT, TO2 expresszió) ráadásul osztódási ütemük is gyorsabb (magasabb cyclin A expresszió, BrdU beépülés). Ezért természetes, hogy a focusok nem random alakulnak ki a máj parenchymában, hanem mindig a distalis ovális sejtekből származnak és egy terminalis portális ág köré rendeződnek, centralis vénákat sohasem foglalnak magukba, azokat félretolják. A focusok szerkezetét vizsgálva az is megállapítható volt, hogy nem tekinthetők a kis hepatocyták véletlenszerű halmazainak, hanem felismerhetőek bennük az ovális sejtek alkotta ductusok maradványai (basalis membrán részletek, a kis hepatocyták

acinaris/tubularis elrendeződése, sinusoid szerű érstruktúrák stb.). Ezek után nem volt meglepő, hogy az ovális sejtek retrovírusokkal történő transduktióját követően végzett „pulse-chase” kísérlet igazolta, hogy a focusok nem clonális eredetűek. Mindezek a szerkezeti megfigyelések igazolják, hogy a progenitor sejtek részvételével zajló regeneráció nem véletlenszerű, hanem egy nagyon jól szervezett biológiai reakció és a focusok is inkább pseudo-focusok, melyekben felismerhető a májparenchymára jellemző elrendeződés és ezért növekedésük során kis átrendeződéssel kialakulhat belőlük a máj eredeti lebenykes szerkezete. (Ezen utóbbi kísérletünk eredményei jelenleg állnak közlés alatt.)

A primer hepatocyta mitogén, TCPOBOP által kiváltott proliferatív válasz vizsgálata

Felnőtt állatok májában intenzív májsejt proliferáció idézhető elő az ún. primer hepatocyta mitogén vegyületekkel is. Ezek közül kísérleteinkben a CAR receptoron keresztül ható TCPOBOP nevű vegyületet vizsgáltuk. A regeneratív hepatocyta proliferáció egyik leghatékonyabb gátlószere a TGF- β növekedési faktor, fokozott expressziójának jelentőséget tulajdonítanak a regeneratív válasz leállításában is. Kísérletünk első felében májukban fokozott mennyiségben aktív TGF- β -t termelő transzgén és azonos genetikai háttérű, de vad genotípusú egerekben vizsgáltuk meg a TCPOBOP által kiváltott proliferatív választ. Meglepő módon sem a kumulatív BrdU beépülésben, sem a „pulse” BrdU beépüléssel vizsgált proliferáció dinamikájában nem találtunk különbséget a két csoport között. Ezzel összhangban a különböző időpontokban vizsgált cyclin A expresszióban sem találtunk szignifikáns különbséget, ami azt jelenti, hogy a TGF- β nem gátolja a TCPOBOP által kiváltott proliferatív választ. A transzgén egérvonalban a TGF- β hatékonyságát bizonyítja, hogy ugyanezen egérvonalon elvégzett parciális hepatectomiát követően a regeneratív válasz jelentősen lassúbb, elhúzódóbb.

A klinikai gyakorlatban a májsebészet egyik nagy elvi problémája a cirrhotikus májak rossz regeneráló képessége. Ennek pontos oka nem ismert, de szerepet játszhat benne a májak fokozott TGF- β termelése is. Ha viszont a TCPOBOP által kiváltott proliferáció rezisztens a TGF- β gátlás iránt érdemesnek gondoltuk megvizsgálni a mitogén vegyület hatását cirrhotikus májakon. Krónikus széntetraklorid, egy másik csoportban pedig tioacetamid kezeléssel idéztünk elő májcirrhozist és ezeket az állatokat kezeltük TCPOBOP-pal. Mindkét cirrhotikus csoportban sikerült jelentős mértékű proliferatív választ kiváltani, bár annak mértéke (BrdU beépülés, cyclin A expresszió) szignifikánsan elmaradt a kontroll (nem cirrhotikus) állatokon tapasztalt választól. A csökkent proliferatív választ legalábbis részben magyarázhatja a fibrotikus májakban tapasztalt fokozott p27 expresszió. Eredményünk így is biztatónak tekinthető, mert feltárja annak a lehetőségét, hogy cirrhotikus májon végzett sebészeti beavatkozást követően primer hepatocyta mitogén hatású vegyületek segíthetik a regenerációt.

TCPOBOP-pal nem sikerült érdemileg befolyásolni sem az ovális sejtek részvételével zajló regeneratív választ, sem pedig a galaktózaminnal előidézett heveny májelégtelenség túlélését. (A TCPOBOP cirrhotikus májra gyakorolt hatásáról szóló kísérleteink jelenleg állnak közlés alatt)

A Hering csatornák jellemzése ép, humán májban

A Hering csatornák, az epeútrendszer legdistalisabb szakaszai, melyek összeköttetést biztosítanak az epeutak és a hepatocyták alkotta epecanaliculusok között. Elnevezésüket leírójukról kapták, aki először figyelt meg olyan rövid, 2-3 sejtsor hosszúságú ductulusokat a májban, melyek alkotásában epeúthámsejtek és hepatocyták egyaránt részt vesznek. Egyértelmű azonosításuk máig is ezen a tulajdonságukon alapul és ezért ehhez

elektronmikroszkópiára van szükség. Az utóbbi évtizedben jelentősen megnőtt az érdeklődés ezen struktúrák iránt, mert egyértelművé vált, hogy az őket felépítő sejtek alkotják a májbeli ős/progenitor sejteket. Korábbi munkánkban leírtuk, hogy patkánymájban a sajátos CK19+/7-immunfenotípus alkalmas ezeknek a struktúráknak az azonosítására, ugyanakkor néhány humán minta vizsgálata azt is egyértelművé tette, hogy ilyen immunfenotípusú epeutak nem találhatók humán májakban. Jelen munkánkban ép, humán májakban jellemeztük az epeút rendszer legdistalisabb szakaszát. A CK7 immunreakció alkalmas volt az epeutak és a hepatocyták egyértelmű elkülönítésére. A CK7 immunfluoreszcens metszetek konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata ill. sorozatmetszetekből számítógép segítségével végzett 3D rekonstrukciós vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az ép emberi májakban az epeutak a periportális kötőszövetből kilépve látszólag betérjednek a májparenchymába. A májparenchyma infiltrációja azonban csak látszólagos, mert az emberi májban is rudimenter formában jelen vannak a néhány más állatfajban pl. teve, jegesmedve jól fejlett interlobularis vascularis (kötőszövetes) septumok és a distalis epe ductulusok ezen septumok mentén tejednek, azaz intraparenchymalisak, de mégsem lépnek be a lobulusok állományába. A tradicionális, eredetileg leírt Hering csatornák csak ezeknek az epeutaknak a terminalis szegmentumának felelnek meg. Ezeknek a hosszú ductulusoknak az egységes, és nagyobb epe utaktól eltérő (CD56+/CD133+/CD10-) immunfenotípusa utal arra, hogy sajátos funkcionális egységet alkotnak. Különböző életkorú emberekből származó májminták vizsgálatával megállapítottuk, hogy ez az elrendeződés és immunfenotípus az újszülöttek májában még nem alakul ki, hanem postnatalisan jön létre. Legnagyobb számban az intraparenchymalis ductulusok 12 év körüli korban voltak megfigyelhetők, később ritkábbá váltak.

A humán májakban előforduló ductularis reakciók osztályozása

Számos emberi májmegbetegedésben szaporodnak fel epeút-szerű képződmények a máj állományában, amiket az utóbbi időben ductularis reakció név alatt szoktak összefoglalni. Ezek a reakciók nem csak különböző betegségekben fordulnak elő, hanem megjelenésükben is jelentős különbségek vannak közöttük, ami tükröződik változatos elnevezésükben (ductularis proliferáció, ductularis hepatocyták, intermedier hepatobiliaris sejtek stb.) is. Sajnos ezek az elnevezések többnyire önkényesek és ezért az ilyen tárgyú közlemények eredményei gyakran nehezen vethetőek össze. A ductuláris reakciók patológiai, biológiai szerepe, jelentősége viszont alig ismert. Véleményünk szerint a ductularis reakciók jobb megértéséhez az első lépésként egy racionális, reprodukálható osztályozásra van szükség. Ez alapján elkülöníthetők lennének a különböző típusok és ezután az egyes típusok önálló vizsgálatával könnyebben lenne tanulmányozható azok szerepe, jelentősége.

Intézetünk szövettani archivumából több mint 60, különböző betegségekben származó, de intenzív ductuláris reakcióval járó májmintát választottunk ki és ezeken immunhisztokémiai reakciókat végeztünk a ductuláris reakciókon leggyakrabban leírt antigének vizsgálatára. Az antitestek többsége (pl. CK7, CK19, EpCAM) valamennyi mintán pozitív eredményt adott, mások (CEA, AFP, DLK, DMBT-1) negatívnak bizonyultak, három antitest eltérő kifejeződése alapján azonban a vizsgált ductularis reakciók többsége három csoportba volt sorolható: I primitív ductulusok (CD56+/EMA-/CD10-); II epeúti obstrukcióval járó ductulusok (CD56-/EMA+/CD10-) és III. hepatocytá irányú differenciálódás jeleit mutató ductulusok (CD56+/EMA+/CD10+). Az I. típusú reakció főként primer biliaris cirrhosisban, FNH-ban fordult elő, a II. epekőbetegségben, a III fulmináns májelégtelenségben, cirrhosisban. Az eredményeinkből készült közlemény, reményeink szerint hasonló vizsgálatokat inspirálhat, ami végül elvezethet a ductularis reakciók racionális osztályozásához.

A DLK expresszió alkalmazása humán daganatok differenciáldiagnosztikájában.

A DLK ismeretlen funkciójú gén, mely magas szinten expresszált a hepatoblastokkal sok hasonlóságot mutató ovális sejtekben. Ez adta az ötletet, hogy megvizsgáljuk a DLK expressziót humán hepatoblastomákon. A vizsgált több mint harminc daganat egyaránt pozitívnak bizonyult, míg a differenciáldiagnosztikailag szóba jövő primitív gyerekkori daganatok és hepatocellularis carcinomák közül csak néhány ganglioneuroblastomában és HCC-ben észleltünk pozitivitást. Ezek alapján a DLK a hepatoblastomák új szenzitív és specifikus markerének felel meg. Hasonlóan hasznosnak bizonyult ez az antitest a mellékvese eredetű phaeochromocytomák és kéregtumorok diagnosztizálására is.